

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Vergleichende Untersuchungen
zur Messung der Serumparaoxonaseaktivität
im menschlichen Serum
mit zwei verschiedenen Verfahren

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Bruno Zeller
aus Hebanz

1903

1983 № 371



Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Vergleichende Untersuchungen
zur Messung der Serumparaoxonaseaktivität
im menschlichen Serum
mit zwei verschiedenen Verfahren

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Bruno Zeller
aus Hebanz

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. V. Becker

Referent: Prof. Dr.Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt

Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 26.09.1983

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546202_0118

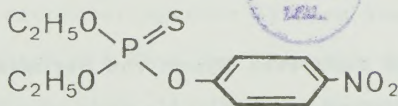
Inhaltsverzeichnis

	Seite
I) Einleitung	1
II) Problemstellung	6
III) Eigene Untersuchungen und Ergebnisse	8
1) Versuchsanordnungen	8
a) nach Krisch	8
b) nach Enders modifiziertes Verfahren	13
2) Sammeln der Serien und Aufbewahrung	16
3) Präzision	17
a) nach Krisch	17
b) nach Enders modifiziertes Verfahren	19
4) Versuchsdurchsführung und Meßergebnisse	20
IV) Statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse	29
1) Aktivitätsverteilung bei beiden Verfahren	29
a) nach Krisch	29
b) nach Enders modifiziertes Verfahren	30
2) Prüfung einer Korrelation beider Verfahren	32
V) Diskussion und Zusammenfassung	33
VI) Literaturverzeichnis	35

1) EINLEITUNG

Die Entwicklung der Organophosphatverbindungen erstreckt sich über einen Zeitraum von mehr als einhundert Jahren. Bereits 1847 entdeckte Thenard mehrere Phosphine. Jedoch erst Michaelis begann mit der systematischen Erforschung der Organophosphatverbindungen.

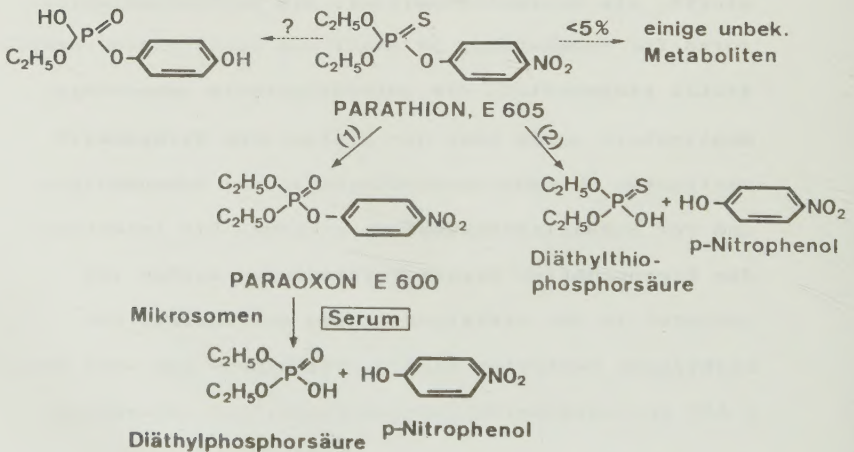
Mitte 1930 begann ein neuer "Boom" der Organophosphatverbindungen. Sie wurden als Weichmacher für Kunststoffe, als Extraktionsmittel, als Oxydationsinhibitoren für Schmieröle, ja sogar als militärische Kampfstoffe eingesetzt. Als interessanteste Anwendungsmöglichkeit wurde aber die biologische Wirksamkeit bestimmter Phosphorverbindungen in der Humanmedizin und der Schädlingsbekämpfung erkannt. Die insektiziden Eigenschaften dieser Verbindungen wurden von Schrader in den vierziger Jahren aufgedeckt. Der wichtigste Vertreter dieser Stoffklasse ist wohl das E 605 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-thiophosphat):



E 605 (PARATHION)

Doch E 605 wirkt nicht nur insektizid, sondern entfaltet seine giftigen Eigenschaften auch beim Tier und beim Menschen (letale orale Dosis beim Menschen: 4 - 15 mg/kg Körpergewicht). Es wird in der menschlichen Leber durch Mikrosomenfermente oxydiert. Dabei wird Schwefel durch Sauerstoff ersetzt, es entsteht Paraoxon (E 600), ein sehr starker Cholinesterasehemmer. Anschließend erfolgt im Stoffwechsel eine enzymatische Hydrolyse des E 600:

Stoffwechsel von PARATHION im Warmblüter



ALDRIDGE (1953a) fand zwei Typen von Serumesterasen, von denen die eine durch E 600 hemmbar war (B-Esterase), die andere nicht (A-Esterase). Wenig später

(1953b) identifizierte er die A-Esterase als ein E 600 spaltendes Enzym, das nicht zu den sauren oder alkalischen Serumphosphatasen gehörte.

AUGUSTINSSON und HEIMBÜRGER (1954) fanden bei sieben Tierarten und beim Menschen ein Enzym, das organische Phosphorverbindungen hydrolisierte. Sie nannten es "Phosphorylphosphatase".

FRIEDBERG und ERDMANN (1959) beobachteten eine Reaktivierung von Cholinesterase nach Vergiftung mit E 600 bei Pferde- und Rinderseren. Auch sie bezeichneten das hierfür verantwortliche Enzym als "Phosphorylphosphatase".

SKRINJARIK, SPOLJAR und REINER (1968) beschrieben die enzymatische Spaltung von E 600 durch menschliches Serum.

KRISCH (1968) zeigte, daß menschliches Serum E 600 in 10^{-4} molarer Konzentration enzymatisch spaltet. Er fand zwei sich überlagernde Gruppen von Probanden, die sich durch die Höhe der Paraoxon spaltenden Aktivität unterschieden. Als Ursache vermutete er genetische Varianten des Enzyms.

GELDMACHER von MALLINCKRODT, LINDORF, (1969) sowie GELDMACHER von MALLINCKRODT, KABAST und LINDORF (1969) erhielten unter Verwendung einer anderen Meßmethode (Anti-Cholinesterase-Technik) eine Aufteilung in drei Gruppen mit niederer, mittlerer und hoher Paraaxonase-aktivität.

GELDMACHER von MALLINCKRODT, LINDORF, PETENYI, FLÜGEL, FISCHER und HILLER (1973) führten Familienuntersuchungen durch, die auf eine genetische Determination des Paraaxonasetypus und ein einfaches Zwei-Allele-System mit trimodaler Verteilung hinwiesen. Das Zwei-Allele-Modell wurde auch durch Untersuchungen von ZECH und ZÜRCHER (1974) und DUMBACH (1976) gestützt.

PLAYFER und Mitarbeiter (1976) konnten diese Ergebnisse für ein Kollektiv britischer Probanden bestätigen. Darüber hinaus untersuchten diese Autoren auch eine Reihe anderer ethnischer Gruppen, nämlich Inder, Malaien, Nigerianer, Chinesen und Keniaten. Von diesen war nur die indische Gruppe mit der britischen bzw. westdeutschen vergleichbar. Bei den anderen Volksgruppen scheint nicht nur eine andersartige Verteilung der Aktivitäten vorzuliegen, vielmehr ließ die gefundene Aktivitätsverteilung an das Vorliegen weiterer

Allele denken. Diese Vermutung wurde auch durch OMURO (1980) erhärtet, der ein Kollektiv von Japanern untersuchte.

II) PROBLEMSTELLUNG

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, werden Messungen zur Vergiftbarkeit des menschlichen Serums mit E 600 zur Zeit hauptsächlich mittels zweier verschiedener Verfahren durchgeführt:

Das ist einmal das Verfahren nach Krisch (1968), mit dem die Paraoxonaseaktivität direkt gemessen wird, das heißt, daß ein direktes Abbauprodukt des E 600, Nitrophenol, photometrisch bestimmt wird.

Zum anderen ist eine Messung der Paraoxonaseaktivität über den Umweg der Bestimmung der Cholinesteraserestaktivität im mit E 600 inkubierten Serumansatz möglich (Geldmacher von Mallinckrodt, Baumgartner, Petyi, Burgis, Lindorf, Metzner 1970). Diese Methode kommt jedoch wegen der dazu nötigen aufwendigen Warburg-Technik kaum mehr zur Anwendung.

Die Nachteile beider Methoden sind sowohl häufiges Pipettieren als auch der relativ hohe Serumverbrauch zur Bestimmung der Paraoxonaseaktivität.

Enders hat deshalb versucht in einem modifizierten Krisch-Verfahren die Nachteile der älteren Verfahren auszuschalten und mit weniger Pipettierschritten und mit weniger Serum auszukommen. Außerdem erhofft man sich von der neuen Methode eine bessere Abgrenzung

der drei Paraoxonaseaktivitätsgruppen.

In der vorliegenden Arbeit soll geprüft werden, ob eine eindeutig signifikante Korrelation zwischen dem Krisch-Verfahren und dem nach Enders modifizierten Verfahren besteht.

III) EIGENE UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE

1) Versuchsanordnungen

a) nach Krisch

Zur Bestimmung der Paraoxonase-Aktivität nach Krisch sind folgende Lösungen und Puffer nötig:

Glycin-Natronlauge-Puffer (0,1 mol/l, pH 11,2)

Das pH-Optimum der enzymatischen Hydrolyse von E⁶⁰⁰ im menschlichen Serum liegt, wie von Krisch (1968) angegeben und von Burgis (1972) bestätigt, bei pH 11,2.

In 900 ml dest. Wasser werden 7,507g Glycin gegeben und solange mit dem Magnetrührer gerührt, bis alles Glycin gelöst ist. Unter ständigem Rühren werden einige Tropfen 35%ige Natronlauge zugegeben, bis der pH einen Wert von 11,2 erreicht. Dann wird die Lösung mit dest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Tris-Puffer (pH 8,0)

In 900 ml dest. Wasser werden 12,114 g TRIS (Tris-hydroxymethyl-amino-methan) gegeben und solange mit dem Magnetrührer gerührt, bis alles TRIS gelöst ist. Unter ständigem Rühren werden einige Tropfen 37%ige Salzsäure zugegeben, bis ein pH-Wert

von 8,0 erreicht ist. Dann wird die Lösung mit dest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Beim ursprünglichen Krisch-Verfahren enthielt der TRIS-Puffer noch Äthylenglykol, um die Löslichkeit des E 600 im Puffer zu steigern. Wie Schuckmann (1981) jedoch beschrieb, ist Äthylenglykol ein Para-oxonasehemmstoff und wurde deshalb weggelassen.

E 600-Stammlösung (12 mmol/l in TRIS-Puffer 0,1 mol/l, pH 8,0)

0,26 ml E 600 (Paraoxon) werden in 100 ml TRIS-Puffer (pH 8,0) durch etwa 10-minütiges kräftiges Schütteln, oder besser noch im Ultraschallbad, emulgiert. Von dieser E 600-Stammlösung, die jede Woche neu angesetzt wird, wird täglich die E 600-Gebrauchslösung hergestellt.

E 600-Gebrauchslösung

Ein Teil der E 600-Stammlösung wird zum Gebrauch jeweils 1 : 5 mit dest. Wasser verdünnt:

10 ml E 600-Stammlösung +

40 ml dest. Wasser

Serum-Verdünnung

Für die Bestimmung der Paraöxonase-Aktivität wird das Serum 1 : 5 mit physiologischer (0,9%iger) Kochsalz-

Lösung verdünnt: 1 ml Serum +
 4 ml 0,9%ige Kochsalzlösung

Die Lösungen in entsprechenden Mengen (z.B.: je 3,3 ml Glycin-Natronlauge-Puffer pH 11,2) werden in Reagenzgläsern im Wasserbad auf 25 °C erwärmt.

Meßansatz:

In ein Reagenzglas werden in folgender Reihenfolge pipettiert: 3,3 ml Glycin-Natronlauge-Puffer (pH 11,2)
 0,5 ml 1 : 5 verdünntes Serum
 1,0 ml E 600-Gebrauchslösung

Nach kräftigem Durchmischen wird ein Teil der Lösung in eine Quarzküvette (Schichtdicke der Küvette: 1 cm) eingegossen.

Meßvorgang:

Vor dem Einbringen der Küvette in das Photometer ist darauf zu achten, daß keine Luftbläschen an den Wänden der Küvette sitzen, die das Meßergebnis verfälschen würden.

Die Extinktionsdifferenz ΔE (bei 405 nm) zu den Zeitpunkten 30 und 180 sec nach Einbringen der Giftgebrauchslösung in das verdünnte Serum wird auf dem Photometer abgelesen.

Zur Kontrolle werden jeweils drei Messungen vom

gleichen Serum durchgeführt (Dreifachbestimmung). Der Durchschnitt aller drei Messungen wird als der Ausgangswert zur Berechnung der Paraoxonase-Aktivität angenommen.

Von diesem Wert wird der unter entsprechenden Bedingungen gemessene Leerwert (statt Serum 0,9%ige Kochsalzlösung) abgezogen. Er entspricht der Eigenhydrolyse des E 600 im Meßansatz.

Gemessen wird photometrisch die Konzentrationszunahme des p-Nitrophenols, eines Abbauproduktes bei der enzymatischen Hydrolyse des E 600, im Meßansatz. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist unter den angegebenen Bedingungen während mehrerer Minuten konstant.

Berechnung:

Zur Umrechnung der Extinktionsdifferenzen in nmol wird der molare Extinktionskoeffizient ($\epsilon = 18,05 \times 10^6$) von p-Nitrophenol (in Glycin-NaOH-Puffer pH 11,2) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm zugrunde gelegt.

10 nmol p-Nitrophenol gelöst in 1 ml hätten demnach bei einer Schichtdicke $d = 1$ cm und der Wellenlänge $\lambda = 405$ nm eine Extinktion von 0,1805.

Unter weiterer Berücksichtigung der Serumverdünnung (Umrechnung auf ml Serum, durch Multiplikation mit 10),

der Meßzeit (Umrechnung auf eine Minute durch Division durch 2,5) und des Ansatzvolumens (=4,8 ml Multiplikation mit 4,8) errechnet sich die Aktivität nach folgender Formel:

$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta E \times 10 \times 4,8 \times 10}{0,1805 \times 2,5} \quad (\text{U/l})$$

$$= \Delta E \times 1063 \quad (\text{U/l})$$

Nicht gebrauchtes E 600 und dessen Lösungen, einschließlich der E 600-haltigen Ansätze werden mit NaOH 2 mol/l hydrolisiert. Die allgemeinen Sicherheitsvorschriften sind unbedingt einzuhalten.

b) nach Enders modifiziertes Verfahren

Zur Bestimmung der Paraoxonase-Aktivität nach dem von Enders modifizierten Verfahren werden folgende Puffer benötigt:

Puffer: 28,80 g 1,3-bis-(tris-(hydroxymethyl))-
(pH 9,5) methyl-amino -propan =
"bis-tris-propan" (Sigma-Chemie)
4,30 g NaCl (Urtitersubstanz Merck)
1,18 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
4,4 mg Ethylendiamintetraessigsäure
(Titriplex II)
20,0 mg Taurocholsäure, Na-Salz
(Calbiochem)

in ca. 860 ml H_2O bidest. lösen, 120 ml HCl (0,2 mol/l) zufügen und nach Temperieren auf 30 °C den pH-Wert mit HCl (0,2 mol/l) auf 9,50 einstellen, anschließend bei 20 °C das Volumen mit H_2O bidest. auf 1000 ml einstellen.

Der Puffer ist im Kühlschrank über mehrere Wochen stabil.

E 600-Reagenzlösung:

Zu 100 ml des Puffers wiegt man 10 mg reines E 600 ein, indem man die Wägung in einem kleinen Glasge-

fäß vornimmt und dieses dann zusammen mit dem Gift in 100 ml Puffer gibt. Dann stellt man durch Schütteln oder besser im Ultraschallbad eine vollständig homogene, möglichst klare Lösung her. Diese Reagenzlösung ist im Kühlschrank höchstens einen Tag stabil, bei 25-30 °C ist sie maximal vier Stunden haltbar.

Praktische Durchführung

Die Messung der Paraoxonase-Aktivitäten wird mit einem Einstrahl-Spektro-Photometer SP6-550 der Firma PHILIPS durchgeführt, das mit dem Rechner HEWLETT-PACKARD 97-S gekoppelt ist. Für die Einhaltung der Meßtemperatur von 30 °C sorgt ein Thermostat.

Die E 600-Reagenzlösung wird jeweils nur in kleinen Mengen erwärmt, die in kurzer Zeit verbraucht sind, so daß die Eigenhydrolyse möglichst gering gehalten wird. Der Rest wird im Kühlschrank aufbewahrt.

In eine Küvette gibt man 50 μ l Serum und anschließend 1,50 ml der E 600-Reagenzlösung. Man mischt den Küvetteninhalt luftblasenfrei und beginnt nach 20 sec mit der Messung. Im gesamten Meßintervall von 116 sec wird die Extinktionsänderung insgesamt viermal bei 402 nm (Extinktionsoptimum von p-Nitrophenol) gemessen und daraus mittels linearer Regression ein Mittel-

-wert gebildet. Dieser wird nach Abzug des Wertes der Eigenhydrolyse der Berechnung zugrunde gelegt.

Zur Kontrolle werden jeweils zwei Messungen hintereinander vom gleichen Serum durchgeführt. Der Mittelwert wird als der Ausgangswert zur Berechnung der Paraoxonase-Aktivität angenommen.

Berechnung:

Aus den um den Wert der nicht enzymatischen Eigenhydrolyse korrigierten Extinktionswerten errechnen sich die entsprechenden Enzymaktivitäten nach:

$$\frac{A}{(U/l)} = 1632 \times \frac{\Delta E}{(\Delta t/min)}$$

Hierbei wird ein Extinktionskoeffizient des p-Nitrophenols von $\epsilon = 19,0 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ zugrunde gelegt.

2) Sammeln der Seren und Aufbewahrung

Die Blutproben stammten von Personen aus Süddeutschland. Die untersuchten Seren kamen zum Teil von Blutspendern der Universität Erlangen (Blutbank) und zum Teil von unseren persönlichen Freunden, Bekannten und sonstigen freiwilligen Spendern.

Die einzelnen Spender waren nicht blutsverwandt, sämtlich gesund, die Auswahl erfolgte zufällig, lediglich auf ein ausgewogenes Verhältnis der Anzahl von weiblichen und männlichen Probanden wurde besonderer Wert gelegt. Das Alter der Versuchspersonen lag zwischen 11 und 58 Jahren.

Mit Serummonovetten der Firma Sarstedt wurden den Probanden ca. 10 ml Venenblut entnommen, das bis zur Messung im Kühlschrank aufbewahrt wurde.

Es wurde darauf geachtet, daß die Versuchspersonen weitgehend nüchtern waren, um ein möglichst klares Serum zu erhalten.

Besonders wurde auch darauf geachtet, daß alle Seren innerhalb von 24 Stunden nach Entnahme ausgemessen wurden, obwohl nach Omuro (1980) Einfrieren oder Aufbewahren über ein paar Tage kaum Einfluß auf die Serumparaoxonase-Aktivität der geprüften Seren hatte. Kurz vor Beginn der Messungen wurde das Blut zur Gewinnung der Seren zwölf Minuten lang bei 2500 Um-

drehungen zentrifugiert und das Serum anschließend abgeschüttet.

3) Präzision

Vor Beginn der Messungen wurde bei beiden Verfahren eine Präzisionsmessung mit Seren bekannter Paraoxonase-Aktivität durchgeführt.

Beim Krisch-Verfahren sollte dabei Präzision des Meßverfahrens und die Richtigkeit der Puffer und Lösungen überprüft werden.

Beim nach Enders modifizierten Verfahren wurde die Präzision an zwei Vertretern verschiedener Aktivitätsgruppen gemessen.

Danach wurden bei beiden Verfahren Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient bestimmt.

a) nach Krisch

Zur Ermittlung der Präzision wurde ein Testserum zwölfmal hintereinander ausgemessen (Tabelle 1)

Tabelle 1: Ermittlung der Präzision für die Bestimmung
der Paraoxonase-Aktivität nach Krisch (1968)
an einem Testserum

Extinktion E nach		ΔE	Aktivität in U/l (abzüglich Leerwert)
30 sec	180 sec		
0,319	0,402	0,083	81,85
0,316	0,394	0,078	76,54
0,319	0,402	0,083	81,85
0,319	0,405	0,086	85,04
0,240	0,324	0,084	82,91
0,249	0,328	0,079	77,60
0,249	0,329	0,080	78,66
0,250	0,329	0,079	77,60
0,261	0,340	0,079	77,60
0,261	0,347	0,086	85,04
0,271	0,353	0,082	80,79
0,266	0,351	0,085	83,98

Aus den gefundenen Werten berechnet man:

Mittelwert:	$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} =$	80,79 (U/l)
Standardabweichung:	$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} =$	3,11 (U/l)
Variationskoeffizient:	$V_k = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}} \% =$	3,85 %

Bei einer 12-fachen Bestimmung der Aktivität des Testserums wurde ein Mittelwert ($\bar{x}$) von 80,79 U/l gefunden.

Die Standardabweichung (s) beträgt 3,11 U/l.

Da die Standardabweichung von der Größe des Mittelwertes abhängig ist, sind die errechneten Werte bei den zwei Analyseverfahren nicht vergleichbar.

Eine vergleichende Aussage erlaubt die relative Standardabweichung (Variationskoeffizient V_k), bei der die Standardabweichung in Relation zum Mittelwert angegeben wird.

Der Variationskoeffizient beträgt 3,85%. Der methodische Fehler liegt also deutlich unter der für enzymatische Untersuchungen erlaubten 10%-Grenze.

b) nach Enders modifiziertes Verfahren:

Zur Ermittlung der Präzision wurden zwei Testseren je zwölfmal hintereinander ausgemessen (Tabelle 2)

Tabelle 2: Ermittlung der Präzision für die Bestimmung der Paraoxonase-Aktivität nach dem nach Enders modifizierten Verfahren an zwei Testseren, eines aus der niederen, eines aus der mittleren Aktivitätsgruppe.

	mittlere Aktivitätsgruppe	niedere Aktivitätsgruppe
Aktivität in U/l	212,0	90,0
(abzüglich Leerwert)	213,0	89,0
	210,0	87,0
	210,0	89,0
	208,0	91,0
	208,0	88,0
	210,0	88,0
	205,0	90,0
	205,0	89,0
	205,0	92,0
	208,0	91,0
	207,0	90,0
Mittelwert $\bar{x}$	208,42 U/l	89,5 U/l
Standardabweichung s	2,68 U/l	1,45 U/l
Variationskoeffizient V_k	1,29 %	1,62 %

Es ergibt sich ein mittlerer Variationskoeffizient von 1,46%. Der methodische Fehler liegt also etwas niedriger als beim herkömmlichen Krisch-Verfahren.

4) Versuchsdurchführung und Meßergebnisse

Nach mehreren Probemessungen und Erreichen einer genügend hohen Präzision bei der Versuchsdurchführung wurde mit der Versuchsreihe begonnen. Gemessen wurden die Seren von 182 Probanden, 91 weiblichen und 91 männlichen.

Folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung der Serumparaoxonase nach Krisch (1968) im Vergleich zu den mit dem nach Enders modifizierten Verfahren erhaltenen Werten. Zusätzlich enthält die Auflistung noch Alter und Geschlecht (1=♂; 2=♀) der Probanden. Die Werte wurden nach steigender Aktivität (in U/l), gemessen mit dem Krisch-Verfahren, geordnet.

Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der Meßergebnisse

A = Geschlecht

B = Alter

C = Aktivität - Krisch-Verfahren

D = Aktivität - nach Enders modifiziertes Verf.

Lfd. Nr.	Name	A	B	C	D
1)	K.H.	2	46	36,14	41,00
2)	G.Ch.	2	41	38,27	-----
3)	G.W.	1	31	41,45	48,00
4)	A.E.-M.	2	22	48,37	64,50
5)	K.M.	1	39	48,89	53,50
6)	B.F.	1	52	49,43	40,00
7)	L.A.	2	49	51,55	59,50

8) S.K.	1	58	52,61	51,50
9) P.H.	1	25	52,62	42,50
10) D.H.	2	45	53,15	58,50
11) B.S.	2	23	55,81	-----
12) F.W.	1	23	57,40	58,00
13) G.H.	2	37	57,40	60,50
14) P.H.	2	43	57,40	58,50
15) L.M.	2	22	58,46	68,00
16) G.B.	2	24	59,52	59,00
17) F.W.	1	28	60,58	76,50
18) Sch.R.	1	37	60,58	64,30
19) B.K.	1	34	60,59	61,20
20) T.J.	1	36	61,12	61,50
21) H.J.	1	26	61,65	60,50
22) H.R.	1	23	62,18	62,50
23) B.K.	2	48	62,19	56,00
24) R.H.	1	28	62,71	69,00
25) H.E.	2	19	62,72	-----
26) v.S.U.	1	23	63,78	57,50
27) K.E.	2	44	64,67	66,50
28) K.G.	1	41	65,37	74,50
29) Z.M.	2	35	65,37	-----
30) K.G.	1	28	65,90	64,50
31) L.K.	1	49	65,90	71,00
32) F.Ch.	2	22	66,44	63,20
33) S.C.	1	30	66,44	68,80

34) M.H.	1	24	66,96	69,50
35) W.P.	2	19	66,96	59,00
36) G.G.	1	21	67,49	66,70
37) G.H.	2	24	68,03	45,50
38) F.Ch.	2	30	68,56	61,00
39) Sch.H.	2	24	68,56	63,50
40) L.J.	2	48	68,74	81,00
41) R.H.-D.	1	26	69,45	69,70
42) Sch.E.	2	28	69,62	62,50
43) B.M.	2	21	69,63	-----
44) B.B.	2	23	70,16	60,00
45) G.B.	2	28	70,16	82,50
46) Sch.U.	1	25	70,16	53,00
47) R.H.	1	37	70,87	67,00
48) L.A.	1	27	71,21	73,00
49) E.S.	2	21	71,75	-----
50) M.A.	1	46	71,75	66,50
51) D.U.	2	25	72,28	73,50
52) M.H.	2	30	72,82	54,50
53) F.K.	1	43	73,34	74,50
54) H.C.	2	23	73,87	80,50
55) L.P.-C.	2	23	74,40	80,00
56) W.R.	1	27	75,47	79,00
57) W.A.	2	28	75,47	-----
58) W.C.	2	25	75,47	-----
59) R.U.	2	23	76,53	69,00

60) R.E.	1	25	76,53	83,00
61) Sch.P.	2	23	76,54	-----
62) Sch.U.	2	22	77,07	84,30
63) W.M.	2	28	77,07	78,00
64) Sch.R.	2	27	77,60	70,60
65) E.E.	2	24	78,13	-----
66) M.J.	1	24	78,13	70,00
67) W.F.	1	29	78,31	54,50
68) M.T.	1	28	78,66	83,30
69) D.K.	1	25	79,19	71,50
70) W.B.	1	25	79,19	74,20
71) K.J.	1	29	79,72	75,70
72) M.R.	1	36	80,25	64,00
73) G.E.	2	37	80,43	76,30
74) B.A.	2	41	80,78	84,00
75) Sch.T.	2	26	82,20	83,00
76) L.M.	1	27	83,44	91,50
77) W.A.	1	28	83,97	71,50
78) B.D.	1	23	83,98	61,50
79) S.P.	2	21	83,98	-----
80) M.W.	1	23	84,33	84,50
81) G.Ch.	2	23	85,04	74,50
82) P.P.	1	27	85,04	81,00
83) H.W.	1	29	85,57	83,00
84) H.O.	1	48	86,10	77,50
85) N.E.	2	24	86,10	74,00

86) K.U.	2	22	86,63	70,50
87) V.S.	2	23	87,70	-----
88) K.J.	2	19	88,76	83,00
89) L.I.	2	24	88,76	77,50
90) F.J.	1	42	92,47	73,00
91) A.I.	2	35	92,48	88,70
92) S.O.	1	32	92,83	85,00
93) K.W.	1	29	93,01	96,00
94) P.K.	2	11	93,54	70,50
95) P.H.	1	32	94,07	90,00
96) F.G.	2	23	97,26	101,50
97) R.A.	2	29	97,26	83,50
98) R.G.	1	49	100,98	74,50
99) F.M.	1	26	103,11	86,90
100) S.G.	1	23	103,64	89,30
101) E.U.	2	20	105,24	-----
102) H.R.	1	26	105,94	85,00
103) K.V.	1	28	107,36	90,00
104) W.G.	1	24	113,74	82,50
105) F.H.	1	55	131,27	102,00
106) D.V.	1	36	144,57	83,50
107) G.D.	2	21	149,34	105,50
108) W.U.	1	31	156,79	111,50
109) S.J.	1	58	158,39	114,30
110) U.W.	1	45	175,40	111,50
111) V.F.	1	22	176,67	105,00

112) E.K.	1	56	179,11	151,50
113) G.U.	1	24	187,08	127,50
114) R.A.	1	45	187,08	141,70
115) W.W.	1	25	190,81	114,50
116) U.J.	2	39	191,34	126,50
117) Sch.R.	1	21	191,86	161,00
118) Z.K.	2	20	197,72	125,50
119) H.B.	2	24	198,25	-----
120) F.D.	2	28	201,97	162,20
121) Sch.E.	1	26	204,09	163,50
122) J.R.	1	34	207,82	127,00
123) G.W.	1	32	208,35	123,00
124) B.C.	2	23	209,94	120,50
125) K.L.	1	36	211,53	152,00
126) G.A.	1	23	214,37	118,00
127) Sch.M.	2	24	215,26	117,00
128) S.M.	2	28	215,26	-----
129) W.E.	1	40	216,85	140,00
130) F.I.	2	35	217,92	135,00
131) S.M.	2	47	218,45	135,50
132) K.I.	2	23	219,68	100,00
133) A.T.	1	26	224,82	-----
134) W.G.	1	23	225,35	147,50
135) K.I.	2	21	226,42	135,00
136) P.H.	2	47	229,07	136,00
137) G.G.	2	22	233,15	153,00

138) F.T.	1	19	233,33	145,00
139) V.M.	2	22	233,85	184,50
140) S.I.	2	22	235,45	152,00
141) H.A.	1	27	236,51	183,50
142) B.P.	1	23	238,11	139,00
143) H.M.	2	40	241,30	-----
144) K.S.	2	17	243,43	-----
145) Sch.M.	2	49	243,43	134,30
146) A.T.	2	42	244,49	143,00
147) Sch.K.	2	21	245,55	181,00
148) G.E.	2	23	247,68	143,00
149) Sch.F.	1	26	250,87	142,50
150) K.H.	2	37	252,46	151,00
151) H.W.	1	22	252,99	143,50
152) K.H.	2	24	252,99	160,50
153) B.H.	1	42	254,05	187,50
154) M.G.	1	44	260,79	178,30
155) P.M.	2	27	261,50	152,50
156) Sch.J.	1	24	266,81	198,00
157) S.H.	2	20	268,93	191,00
158) K.G.	2	25	273,72	193,00
159) L.P.	1	54	274,25	202,50
160) T.G.	2	23	279,92	197,50
161) R.H.-P.	1	26	281,69	163,50
162) V.C.	2	36	284,88	162,00
163) B.H.	1	23	287,54	161,50

164) G.K.	1	55	296,79	194,30
165) F.M.	2	24	297,64	158,00
166) S.A.	2	45	308,27	191,50
167) F.M.	2	29	310,75	195,00
168) Z.B.	1	23	312,87	219,70
169) G.R.	2	50	320,67	199,00
170) G.K.	2	54	327,93	225,50
171) K.G.	1	23	329,52	250,50
172) H.A.	1	37	355,04	-----
173) R.R.	2	50	366,20	200,00
174) Sch.M.	2	22	367,09	214,50
175) Sch.H.	1	42	381,08	232,00
176) F.H.	1	40	408,19	210,50
177) A.W.	1	32	430,51	324,00
178) Z.K.	2	20	434,77	221,50
179) J.R.	2	48	440,08	265,20
180) H.E.	2	18	514,49	316,60
181) A.M.	1	36	541,07	263,50
182) Sch.G.	1	24	737,72	333,30

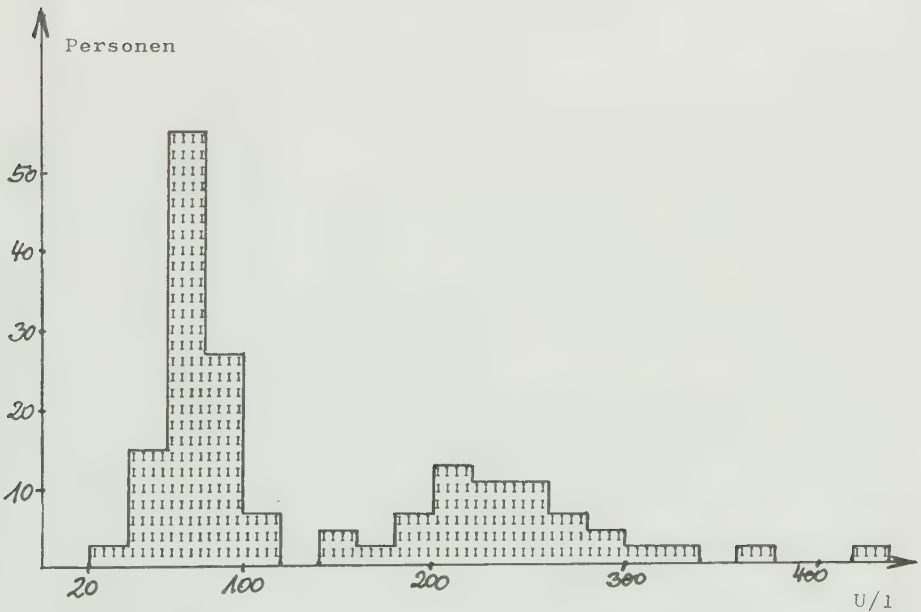
IV) STATISTISCHE AUSWERTUNG DER UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

1) Aktivitätsverteilung bei beiden Verfahren

a) Krisch-Verfahren

Die Aktivitätsverteilung des Gesamtkollektivs, gemessen mit dem Krisch-Verfahren, ist in Abb. 1 dargestellt.

Abb. 1: Aktivitätsverteilung bei dem Krisch-Verfahren



Das Diagramm enthält insgesamt 181 Werte, ein Wert (737,72 U/1) konnte nicht mehr graphisch dargestellt werden.

Die bereits in früheren Arbeiten (z.B.: Geldmacher-v.M. und Mitarbeiter 1973) ermittelten Gruppengrenzen wurden bestätigt:

niedere Aktivität / mittlere Akt. 120 U/l

mittlere Aktivität / hohe Akt. 340 U/l

ebenso die prozentuale Verteilung auf die drei verschiedenen Gruppen:

niedere Aktivität: 57,1 %

mittlere Aktivität: 36,8 %

hohe Aktivität: 6,1 %

b) neue Methode nach Enders

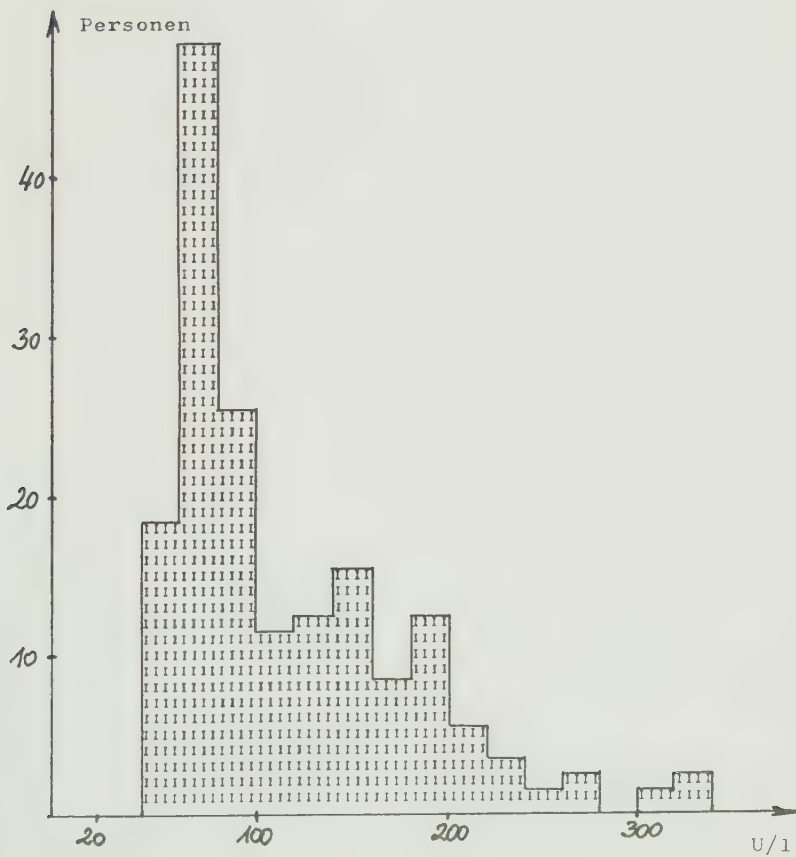
Die Aktivitätsverteilung der Gesamtkollektivs, gemessen mit dem nach Enders modifizierten Verfahren, ist in Abb. 2 dargestellt.

Das Diagramm enthält insgesamt 163 Werte.

Mit dem nach Enders modifizierten Verfahren konnten aus technischen Gründen nur die ersten 163 Seren ausgemessen werden.

Es ergibt sich eine deutlich links-schiefe Verteilung, die unimodal wirkt, ohne Abgrenzung von drei Aktivitätsgruppen. Die Hoffnung auf eine schärfere Trennung der drei Aktivitätsgruppen hat sich also nicht erfüllt.

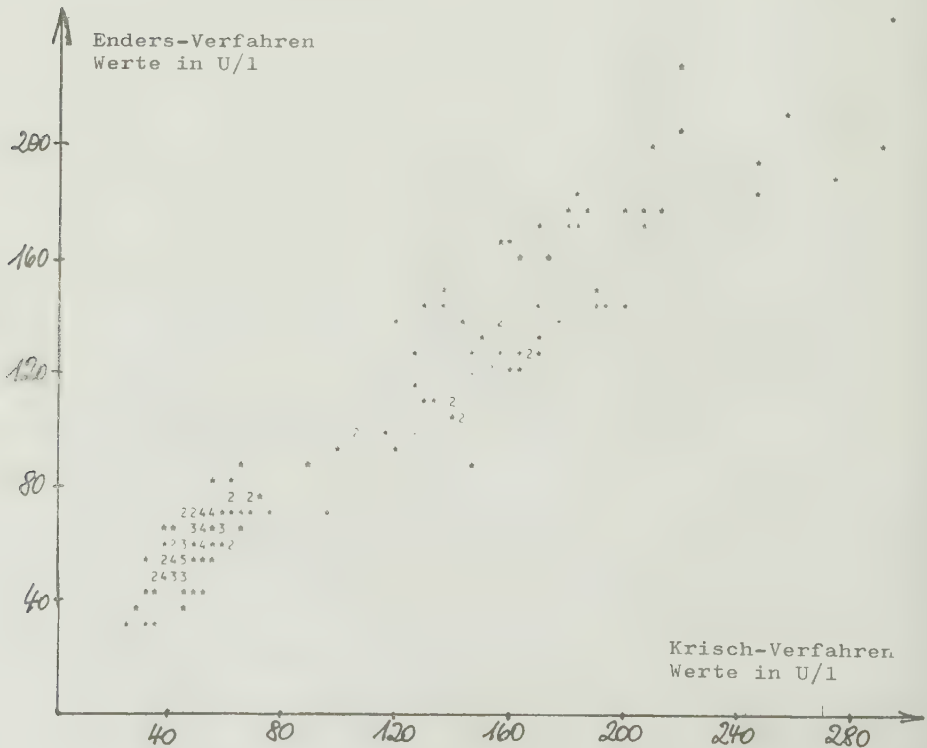
Abb. 2: Aktivitätsverteilung beim Enders-Verfahren



2) Prüfung einer Korrelation beider Verfahren

Die Aktivitätswerte der 163 Seren, die mit beiden Verfahren gemessen wurden, dienten als Grundlage zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten zwischen dem Krisch-Verfahren und dem nach Enders modifizierten Verfahren (Abb. 3). Es ergab sich ein hoher Wert von $r = 0,96$.

Abb. 3: Graphische Darstellung der Korrelation
beider Methoden



V) DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

Die in der vorliegenden Arbeit mit dem Krisch-Verfahren (1968) gemessenen Werte der Serumparaoxonase-Aktivität bei 182 Probanden stimmen hinsichtlich Gruppenverteilung und Gruppengrenzen mit bereits in früheren Arbeiten ermittelten Werten überein.

Von den 182 Seren wurden 163 gleichzeitig mit dem nach Enders modifizierten Verfahren ausgemessen, wobei die Messung mit der neuen Methode folgende Vorteile bietet:

- geringerer Arbeitsaufwand:
weniger Puffer und Lösungen, kürzere Meßzeit
- geringerer Serumbedarf
- höhere Präzision und Reproduzierbarkeit:
für einen Wert sind weniger Messungen notwendig

Bei den Vergleichsmessungen wurde eine hohe, eindeutig signifikante Korrelation von $r = 0,96$ erzielt, d.h. die Werte aus beiden Verfahren sind sehr gut miteinander vergleichbar.

Die Hoffnung allerdings, mit der neuen Methode eine bessere Abgrenzung der drei Paraoxonase-Aktivitätsgruppen zu erzielen, hat sich leider nicht erfüllt. Vielmehr haben die Versuche eine deutlich linksschiefe Verteilung, die unimodal wirkt, ohne Gruppenabgrenzung ergeben.

Abschließend bleibt zu sagen, daß für Routineuntersuchungen (z.B.: Messung der Paraoxonase-Aktivität bei Menschen, die mit E 605 zu tun haben) die neue Methode, ihrer Vorteile wegen, sehr geeignet ist. Für wissenschaftliche Untersuchungen aber, bei denen die Gruppenzugehörigkeit von großer Bedeutung ist (z.B.: wie wird die Paraoxonase-Aktivität vererbt?) die Krisch-Methode wohl die Methode der Wahl bleiben wird.

VI) LITERATURVERZEICHNIS

ALDRIDGE, W.N.:

Serumesterases. 1. Two types of esterases (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination.

Biochem. J. 53, 110 (1953 a)

ALDRIDGE, W.N.:

Serumesterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera.

Biochem. J. 53, 117 (1953 b)

AUGUSTINSSON, K.-B., HEIMBÜRGER, G.:

The enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds

Biochem. Biophys. Acta 13, 303 (1954 a)

AUGUSTINSSON, K.-B.:

Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds. IV. Specificity studies.

Acta Chem. Scand. 8, 1533 (1954 b)

AUGUSTINSSON, K.-B., HEIMBÜRGER, G.:

Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds. V. Effect of phosphorylphosphatase on the inactivation of cholinesterase by organophosphorus compounds in vitro.

Acta Chem. Scand., 2, 310 (1955)

DUMBACH, J.:

Statistische Analyse zur Genetik der menschlichen Serum-Paraoxonase (EC 3.1.1.2.)

Dissertation Erlangen 1976

ENDERS, P.:

Persönliche Mitteilungen

ERDŐS, E.G., BOGGS, L.E.:

Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood.

Nature (Lond.) 190, 716 (1961)

FRIEDBERG, K.D., ERDMANN, W.D.:

Spontane Reaktivierung der durch Alkylphosphate (Paraoxon, Systox, Isosystox) blockierten Cholinesterase in vitro.

Arch. exp. Path. Pharmacol. 237, 1 (1959)

GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M., BAUMGARTNER, W.,
PETENYI, M., BURGIS, H., LINDORF, H.H., METZNER, H.:

Korrelation zwischen der unterschiedlichen Ver-
giftbarkeit der Serumcholinesterase durch E 600
und der Aktivität des E 600-spaltenden Enzym-
systems in menschlichen Seren.

Z. Physiol. Chem. 353, 217 (1972)

GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M., RABAST, U.,
LINDORF, H.H.:

Unterschiedliche Reaktionen menschlicher Serum-
cholinesterasen mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-
nitrophenyl)-phosphat).

Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)

GELDMACHER- v.MALLINCKRODT, M., LINDORF, H.H.,
PETENYI, M., FLÜGEL, M., FISCHER, Th., HILLER, Th.:

Genetisch determinierter Polymorphismus der
menschlichen Serum-Paraoxonase (EC 3.1.1.2.).

Humangenetik 17, 331 (1973 a)

GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M., PETENYI, M.,
FLÜGEL, M., BURGIS, H., DIETZEL, B., METZNER, H.,
NIRSCHL, H., RENNER, O.:

Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonase.

Z. Physiol. Chem. 354, 337 (1973 b)

GELDMACHER-v. MALLINCKRODT, M., HOMMEL, G.,
DUMBACH, J.:

On the gentics of the human serum paraoxonase
(EC 3.1.1.2.).

Hum. Genet. 50, 313 (1979)

HARTL, W.:

Untersuchungen über den Einfluß steigender Ca^{2+} -
-Konzentrationen im menschlichen Serum auf die
Aktivität der Serum-Paraoxonase.

Dissertation Erlangen 1979

HECHTEL, R.:

Die Hemmung der menschlichen Serum-Paraoxonase
(EC 3.1.1.2.) durch EDTA.

Dissertation Erlangen 1980

KRISCH, K.:

Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenyl-
phosphat (E 600) durch menschliches Serum.

Z. Klin. Chem. und Klin. Biochem. 6, 41 (1968)

LINDORF, H.H.:

Die Hemmung der menschlichen Serum-Pseudocholin-
esterase (EC 3.1.1.8.) in vitro durch E 600 und
ihre Reaktivierbarkeit mit PAM unter Berücksich-
tigung von Temperatur, Zeit und fermentativer
E 600-Spaltung.

Dissertation Erlangen 1972

MAIN, A.R.:

The purification of the enzyme hydrolysing di-
ethyl-p-nitrophenyl phosphate (paraoxon) in
sheep serum.

Biochem. J. 74, 10 (1960)

MOESCHLIN, S.:

Klinik und Therapie der Vergiftungen.

Thieme, Stuttgart 1980

MOUNTER, L.A.:

Some studies of enzymatic effects of rabbit serum.

J. Biol. Chem. 209, 813 (1954)

NEAL, R.A.:

Enzymic mechanism of metabolism of the phosphoro-
thionate insecticides.

Arch. Intern. Med. 128, 118 (1971)

OMÜRO, O.:

Serum-Paraoxonase-Poymorphismus in Japan.

Dissertation Erlangen 1980

PLAYFER, J.R., EZE, L.C., BULLEN, M.F.,

EVANS, D.A.P.:

Genetic polymorphism and interethnic variability
of plasma paraoxonase activity.

J. Med. Gen. 13, 337 (1976)

POORE, R.E., NFAL, R.A.:

Evidence for extrahepatic metabolism of parathion.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 23, 759 (1972)

SCHAUMANN, W.:

Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität in vitro
und Berechnung der Aktivität in vivo nach Ver-
giftung mit Alkylphosphaten.

Naunyn-Schmiedeberg's arch. exp. Path. Pharmak.

239, 81 (1960)

SCHAUMANN, W., SCHILLER, M.:

Inaktivierung von Alkylphosphaten im Gehirn und
im Serum.

Arch. Exp. Path. Pharmakol. 239, 114 (1960)

SCHRADER, G.:

Die Entwicklung neuer Insektizide auf Grundlage
organischer Fluor- und Phosphorverbindungen.

2. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim (1952)

SCHRADER, G.:

Die Entwicklung neuer insektizider Phosphor-
säureester.

Verlag Chemie Weinheim (1963)

SKRINJARIC-SPOLJAR, M., REINER, E.:

Hydrolysis of diethyl-p-nitrophenylphosphate
and ethyl-p-nitrophenyl-ethylphosphate by
human sera.

Biochem. Biophys. Acta 165, 289 (1968)

SCHUCKMANN, P.:

Der Einfluß von Äthylenglykol auf die hydrolytische
und enzymatische Spaltung von Paraoxon.

Dissertation Erlangen 1981

ZECH, R., ZÜRCHER, K.:

Organophosphate splitting serum enzymes in
different mammals.

Comp. Biochem. Physiol. (B) 48, 427 (1974)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Dr. GELDMACHER v. MALLINCKRODT für die Überlassung des Themas, die Übernahme des Referates und die hilfreiche und freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche bedanken.

Herrn Prof. Dr. WUERMELING danke ich für die Übernahme des Korreferates und Herrn Dipl. Chem.

P. ENDERS für seinen Rat und seine Hilfe.

Insbesondere danke ich aber auch den vielen freiwilligen Blutspendern, die diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben.

Hebantz, im April 1983

Bruno Zeller

LEBENS LAUF

Name: Z E L L E R Bruno

Geb.-Datum: 25. Januar 1957

Geb.-Ort: Marktleuthen

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Eltern: Z E L L E R Josef; Fachstudienrat
Z E L L E R Erna geb. Stöhr; Hausfrau

Schule: von Sept. 63 bis Juli 65

Volksschule in Habnith

von Sept. 65 bis Juli 67

Volksschule in Kaiserhammer

von Sept. 67 bis Mai 76

Gymnasium in Selb

Studium: von Nov. 76 bis Juli 81 Studium der Zahn-
medizin an der Friedrich-Alexander-Univer-
sität Erlangen-Nürnberg

Staatsexamen im Dez. 81

Bestallung zum Zahnarzt im Dez. 81

Bisherige Tätigkeiten: seit März 82 Ableistung des
Grundwehrdienstes bei der Bundeswehr in
Hemau

